315—322 23560(21)

动 物 学 研 究 1996，17（3）：315—322 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

免疫印迹技术的一些改进

吴传芬[1] 代嘉陵[2] 李靖炎[2]* 王永潮[1]
（1.北京师范大学生物系 100875）
（2.中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 650223）

Q503

摘要 本文描述了作者在研究低等生物着丝粒蛋白过程中对免疫印迹技术所作的一些改进：

1. 分离胶由12%SDS聚丙烯酰胺均一胶改作5%—12%（或15%）的线性梯度胶，使不同分子量范围的蛋白都能得以较好地分离；

2. 用眼虫色素代替溴酚蓝作示踪剂，以能适时地终止电泳；

3. 转移由400 mA 3.5 h改为200 mA 17 h，由冰箱内空气冷却改为流水浴冷却，提高了冷却效率；

4. 对转移后的硝酸纤维素膜作除SDS处理；使转移后的蛋白在一定程度上得以复性；

5. 抗体孵育温度由37℃或室温1—2 h改为4℃冰箱过夜，降低了本底，提高了印迹反应的特异性。

我们已用改进后的方法对一些低等生物作了一系列的着丝粒蛋白研究，取得了比较满意的结果。

关键词 免疫印迹，电泳，转移 生化技术

自Towbin等人于1979年建立了免疫印迹技术（Towbin等，1979）后，人们在实验中通常都采用Laemmli的SDS-PAGE技术（Laemmli, 1970）和Towbin等人的印迹技术。但是我们在研究过程中发现其结果往往不稳定。为了建立一个比较令人满意的程序，我们进行了一系列的摸索和改进，收到了较好的效果。

1 初始方法

1.1 材料

人喉癌培养细胞*Hep*Ⅱ和小眼虫（*Euglena gracilis*）的SDS全细胞蛋白样品。

1.2 抗体

一抗（ACA血清） ACA血清是自身免疫性疾病患者中患CREST综合症

吴传芬现在地址：美国Texas大学，M D Anderson Cancer Center，分子遗传学系，Houston，Texas 77030

* 通信作者

本文1995年7月29日收到，1996年3月4日修回

(Calcinosis，钙沉着；Raynaud's phenomenon，雷诺氏现象；Esophaged dymobility，食道运动障碍；Sclerodactyly、指或趾皮硬化；Telangiectasia，毛细血管扩张性变异5种病症，取每个字的第1个字母构成CREST）的进行性、系统性硬皮病人的含有抗着丝粒蛋白抗体的血清（Anti-Centromene Auto antibodies、称为ACA血清）。本实验用的ACA血清是王永潮教授实验室与北京协和医院合作从国内硬化肌膜炎病人血清中筛选出的。对照实验用正常的人血清。

二抗 FITC标记的羊抗人IgG或辣根过氧化物酶标记的羊单抗人IgG，为北京生物制品研究所或军事医学科学院产品。

1.3 溶液

聚丙烯酰胺凝胶贮液：30%丙烯酰胺-0.8%甲叉双丙烯酰胺，配好过滤备用。

浓缩胶缓冲液：125 mM Tris-HCl (pH6.8)-0.1%SDS。

分离胶缓冲液：0.375 M Tris-HCl (pH8.8)-0.1%SDS。

电极缓冲液：0.025 M Tris-0.192 M 甘氨酸-0.1%SDS。

样品缓冲液：10%甘油-2.5%SDS-5%β-巯基乙醇-1.2 mM PMSF。

凝胶染色液：50%三氯醋酸-0.1%考斯亮蓝R250。

脱色：7%醋酸。

硝酸纤维素膜染色液：0.1%氨基黑-45%甲醇-10%乙酸。

脱色液：45%甲醇-10%乙酸。

转移液：含20%甲醇的电极液。

TBS液：20 mM Tris-HCl (pH7.4)-15 mM NaCl。

TTBS液：含0.05%或0.1% Tween20的TBS液。

封闭液：含4%脱脂奶粉的TBS液。

抗体孵育液：含4%脱脂奶粉的TTBS液。

显色缓冲液：在11.8 ml 100 mM的柠檬酸三钠溶液中加入8.2 ml 100 mM的柠檬酸溶液混匀即成。

显色液：在显色缓冲液中加入适量的联苯胺的甲醇贮液。

停显液：TBS-10 mM EDTA液。

1.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE基本按照Laemmli的方法（Laemmli, 1970）。

电泳板规格：125 mm×100 mm×1.5 mm。

浓缩胶：浓度5%，pH6.8，长15—20 mm。

分离胶：浓度12%，pH8.8。

上样：200—500 μg／孔。

电泳：恒流，浓缩胶10 mA；分离胶20—25 mA，直至指示剂溴酚蓝前沿走到胶板底线为止。

固定与染色：室温或37℃温箱中过夜。

脱色：在7%乙酸溶液里室温或37℃温箱中脱色。

1.5 印迹

转移：60 V(380—400 mA)2 h 左右，4℃冰箱内进行。

TBS 洗涤：3×5 min，轻轻摇晃。

封闭：37℃　1—2 h。

TTBS 洗涤：3×5 min，摇晃。

一抗（ACA 血清）孵育：37℃　1 h 或室温 1.5—2 h。

TTBS 洗涤：3×10 min，摇晃。

酶标二抗：37℃　1 h 或室温 1.5—2 h。

TTBS 洗涤：3×10 min，摇晃。

酶标二抗：37℃ 1 h 或室温 1.5—2 h。

TTBS 洗涤：3×10 min，摇晃。

TBS 洗涤：3×5 min，摇晃。

显色：20 ml 显色液中加适量联苯胺甲醇贮液，摇匀，放入印迹膜，加入适量过氧化氢，轻轻、缓慢摇动。

停显色：显色完成后，膜用停显色液处理 3—5 min，用滤纸吸干，放在阴凉、干燥处避光保存，照相。

1.6 结果

印迹结果，眼虫样品在约 35 kD 处有 1 条反应很强的带，而 *Hep*Ⅱ细胞样品则 1 条带也没有。用氨基黑染印迹膜的结果表明，眼虫和 *Hep*Ⅱ的许多蛋白带虽然转移上了，但是量都太少。转移后的凝胶染色表明，胶中还有许多蛋白未转走。

2 改进实验

2.1 转移

上述结果表明蛋白质的转移量不够，因此对转移作如下的修改。

2.1.1 第 1 次实验　延长转移时间

转移条件为 400 mA 恒流即（60 V 左右）、4℃冰箱内 5.5 h。印迹后眼虫有 30 kD 和 35 kD 两条带，*Hep*Ⅱ有 20 kD 左右的 1 条带。检查转移后的膜和胶块结果是转移到膜上的蛋白的量虽有增加但还是太少。胶中有许多分散蛋白扩散的小点，而且膜皱得很利害。这可能是由于转移大、时间长发热过高所致，应减少发热。

2.1.2 第 2 次实验　降低电流、延长时间

在 4℃冰箱内 100 mA 恒流 10 h 过夜转移。印迹后眼虫只有 35 kD1 条带，*Hep*Ⅱ仍为 20 kD 带（图 1），膜不皱，发热有所控制。转移到膜上的中等分子量及以上的蛋白带着色极浅，胶中还有未转走的蛋白带，蛋白转移显然不够。应加大电流或延长时间，但必须采取有效的冷却措施。

2.1.3 第 3 次实验　延长转移时间、用流水浴冷却

在实验中我们发现，4℃冰箱对转移槽的冷却效果远不如用自来水流水浴的冷却效果好。因为前者尽管温度较低（4℃），但靠空气对流，散热太慢。后者温度虽不如前者低，但靠液体传导，散热速度比空气快，实际冷却效果更好。

在第 3 次实验中，转移条件为 100 mA 18 h，自来水流水浴冷却。印迹后眼虫有

30 kD 和 35 kD 两条带，*Hep*Ⅱ仍为 20 kD 1 条带（图 2）。但检查转移后膜和胶，结果与第 2 次实验相比无明显改进。看来是转移电流不够大而不是转移时间不够长。

2.1.4 第 4 次实验 在(3)的基础上加大电流

转移条件为 200 mA 恒流 18 h，自来水流水浴冷却。印迹后眼虫在 14—35 kD 之间有 5 条带，*Hep*Ⅱ有 20 kD 和 35 kD 两条带（图 3)。印迹结果明显有改善，但 35 kD 分子量以上始终未出现带。对转移后膜和胶的检查表明，35 kD 以上的蛋白转移得仍很少。

2.1.5 小结 从上看出用 12%均一分离胶、高电流(400 mA)转移、时间短(2 h)，转移蛋白量不够，时间长(5.5 h)，发热太高，影响转移。用低电流(100 mA)，即使是冷却良好，长时间转移(18 h)，蛋白量转移也不够。用中强电流(200 mA)，保证冷却，长时间转移(18 h)，低分子量蛋白转移量有明显改进，但中、高分子量蛋白的转移量仍无明显增加。

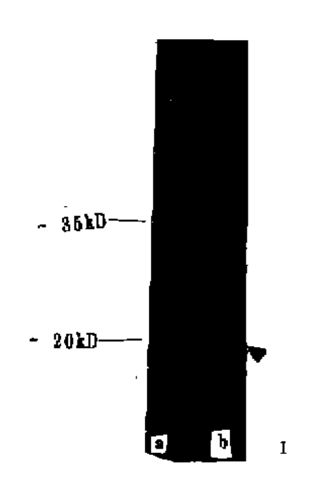


图1 第2次改变转移条件后的印迹结果

Fig.1 The immunoblotting result after secondly modifying the conditions

a. 小眼虫的印迹结果(The immunoblotting result of *E gracilis*)；

b. *Hep*Ⅱ印迹后又经过氨基黑10B染色，箭头示印迹阳性带(The immunoblotting result of human *Hep*Ⅱ cells, aminoblack 10B stained)。

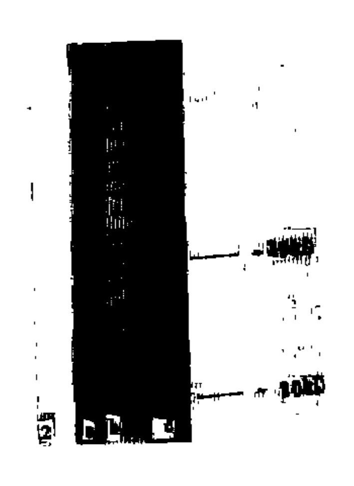


图2 第3次改变转移条件后的印迹结果

Fig.2 The immunoblotting result after thirdly modifying the conditions

a. *Hep*Ⅱ；

b. 小眼虫(*E. gracilis*)；

c *Hep*Ⅱ转移后氨基黑10B染色(The immunoblotting result of *Hep*Ⅱ cells, stained by aminoblack 10B)。

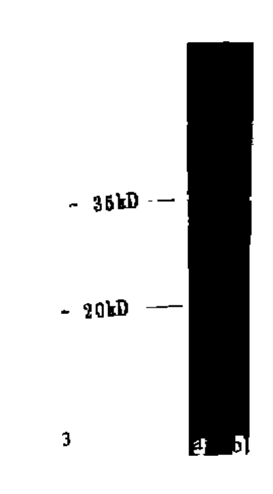


图3 第4次改变转移条件后的印迹结果

Fig. 3 The immnoblotting result after fourthly modifying the conditions of transference

a. *Hep*Ⅱ；

b. 小眼虫(*E. gracilis*)。

2.2 电泳

上述结果说明在我们的系统中，使用 12%均一分离胶时，低分子量蛋白转移的量随着转移电流强度和转移时间的增加而增加，但是中、高分子量的蛋白的转移受阻碍。这可能是胶浓度太高阻碍转移，因为在一定凝胶孔径下，分子量越大的蛋白，转移效果越差；反之对一定分子量的蛋白来说，凝胶浓度越小，转移效果越好（范培昌，1989）。

我们还观察到用溴酚蓝作示踪剂不太好，因染料的前沿距蛋白样品前沿甚远，难于估

计电泳终止时间。在实验中我们发现眼虫样品的色素在 SDS-PAGE 中泳成很宽的一个区带，其前沿与溴酚蓝的相近，后缘与蛋白样品的前沿接近。故用它代替溴酚蓝作示踪剂效果更好。

2.2.1　第 1 次实验　用 10%的均一分离胶印迹后，眼虫和 *Hep*Ⅱ除了图 3 中的阳性带外，在中等分子量区域又出了 1 条带（图 4）。结果有明显的改进，但高分子量区域还是没有出现阳性带。看来胶浓度需要进一步降低。

2.2.2　第 2 次实验　用 8%的均一分离胶印迹后，在比 50 kD 更高的分子量区域，眼虫和 *Hep*Ⅱ分别又出现了 1 条和两条带（图 5）。胶浓度降低后对印迹效果的改进是很明显的，但是高分子量区域仍然还出现阳性反应带。说明 8%的胶浓度对于高分子蛋白的转移还是有妨碍。如果在 8%基础上再下降，可能会影响低分子量区域蛋白带的分离。因为不同浓度的凝胶适合于分子量范围不同的蛋白分子。5%的胶适合于 25—200 kD 的蛋白；10%的胶适合于 10—70 kD 的蛋白，15%的胶适合于 10—50 kD 的蛋白（Weber 等，1975）。因此最好对不同分子量区段的蛋白采用不同浓度的胶分离。采用非均一胶也许能达到这种效果。

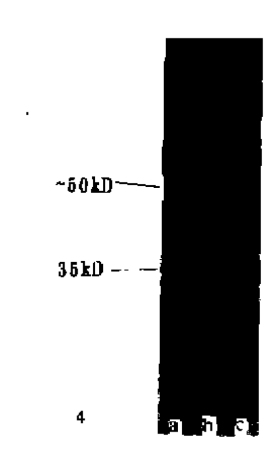


图 4　第 1 次改变电泳条件后的印迹结果

Fig.4　The immunoblotting result after firstly modified the conditions of electrophoresis

用眼虫色素代替溴酚蓝作示踪染料，转移后对膜作除 SDS 处理（Thd pigment of *Euglena* was used as mark to replace bromophenol blue. After transference the membrane was treated to remove SDS）。

a. *Hep*Ⅱ转移后经氨基黑10B染色(The result of *Hep*Ⅱ cells, aminoblack 10B stained)；b 和 c 分别为 *Hep*Ⅱ和小眼虫的印迹结果(The immunoblotting results of *Hep*Ⅱ cells and *E. gracilis*)。

2.2.3　第 3 次实验　用线性梯度分离胶(用 5%—12%的线性梯度分离胶，3%的浓缩胶)印迹后眼虫和 *Hep*Ⅱ细胞从低分子量区（20 kD）到高分子量区（140 kD）都出了若干阳性反应带（图 6）。检查转移后的膜，发现从低分子量到高分子量区蛋白都转上了，而且比印迹的反应带更多、更密、量也更大。胶的染色表明高分子量区既无带也无蛋白扩散的小点存在，说明转移比较充分。用梯度胶其分辩率高、转移也比较充分，得到的效果比较满意。

2.2.4　小结　在我们的工作系统中，使用 3%浓缩胶，5%—12%线性梯度分离胶、200 mA 转移 18 h 比较适合。

2.3　转移后膜作脱 SDS 处理

经过 SDS 电泳和转移后的蛋白质都是与 SDS 结合的。为了避免 SDS 对印迹结果的影响，对转移后的膜及其上的蛋白作处理以尽可能除去 SDS 是必要的（Symington 等，1981；De Blas 等，1983）。对于除去 SDS-PAGE 后蛋白质中 SDS 虽然已有不少成功的方法报道，但都不适合我们实验所需。我们采用充分漂洗与 TritonX-100 处理相结合的办法。即先用单蒸水漂洗 3 次，再用双蒸水漂洗 3 次，尔后用含 0.1%TritonX-100 的 TBS 浸泡，4℃放置，30 min 换 1 次液，共换 3 次，用 TBS 洗 3 次，每次 5 min。通过漂洗使胶和蛋白上粘附的 SDS 洗去，而通过含 TritonX-100 溶液的浸泡可以使与蛋白质结

合的部分 SDS 除去，因为两种去垢剂之间彼此是有干扰的（Bowen 等，1980）。图 4、5、6 是经过处理的结果。

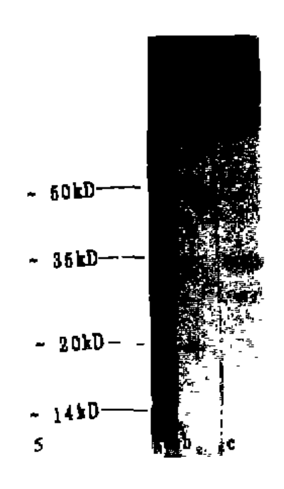


图5 第2次改变电泳条件后的印迹结果

Fig.5 The immunoblotting result after secondly modifying the conditions of electrophoresis

a. *Hep*Ⅱ 转移后经氨基黑 10B 染色(The result of *Hep*Ⅱ cells, aminoblack 10B stained)；b 和 c 分别为 *Hep*Ⅱ 和小眼虫的印迹结果(The immunoblotting results of *Hep*Ⅱ cells and *E. gracilis*)。

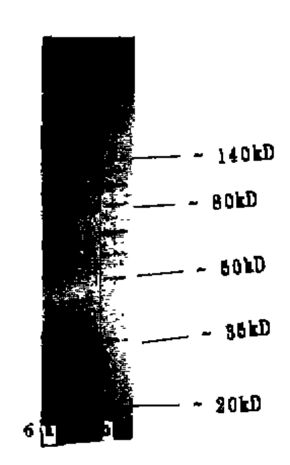


图6 第3次改变电泳条件后的印迹结果

Fig.6 The immunoblotting result after thirdly modifying the conditions of electrophoresis

a. 小眼虫(*E. gracils*)；b. *Hep*Ⅱ。

2.4 改变抗体孵育的温度

Thean 等（1989）在实验中发现，免疫印迹过程中温度对于封闭和抗体孵育有很大的影响。他们分别在 37℃、22℃和 4℃条件下的检查，结果表明，37℃下孵育的灵敏度高，但本底也高。随着孵育温度降低，本底也低，特异性提高。他们发现在 4℃下孵育，并将 TTBS 中的 Tween20 浓度由 0.05%改为 0.1%后得到的结果特异性最好，本底最低。因此我们改用了他们的方法，得到比较满意的结果（图 6）。

3 改进后的方法

经过以上实验摸索出了对我们的研究适合的免疫印迹技术：

3.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE 以 Laemmli（1970）的方法为基础作如下修改：

3.1.1 浓缩胶浓度用 3%，分离胶用 5%至 12%、15%或 20%的线性梯度胶，视分离的组分而定。

3.1.2 样品用 Laemmli 样品液裂解后，再加入适量固体 SDS，沸浴加热处理 15 min 以上，视样品体积而定。

3.1.3 隔孔上样，以免样品互相串孔，保证转移的准确性。

3.1.4 电泳时用眼虫色素为示踪剂，以其后缘走到胶板底线为终止电泳的标准。

3.2 转移和印迹

以 Towbin 等人（1979）的方法为基础作下列改动：

3.2.1 转移用 200 mA 恒流 18 h 左右，用自来水流水浴冷却转移槽。

3.2.2 转移后的膜作除 SDS 处理。

3.3.3 封闭、一抗、二抗孵育均在 4℃冰箱内过夜进行。洗涤用的 TBS、TTBS 均事先预冷再用。

我们已用修改的方法对一些低等生物作了一系列的着丝粒蛋白研究，另有专文报道。

参 考 文 献

范培昌、1989. 生物大分子印迹技术. 上海：上海科技文献出版社. 28—35.

Bowen B J, Steinberg U K, Leammli W H, 1980. The detection of DNA binding proteins by protein blotting. *Nucl. Acids Res.*, **8**: 1-20.

De Blas A L, Cheminki H M, 1983. Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antobodies. *Anal. Bichem.*, **133**: 214-219.

Leammli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

Symington J, Green M, Karl B, 1981. Immunoautoradiographic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: analysis of adenovirus encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 177-181.

Thean E T, Toh B H, 1989. Western immunoblotting: temperature-dependent reduction in background staining. *Anal. Biochem.*, **177**: 256-258.

Towbein H, Steahelin T, Gordon J, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.

Weber K, Osbon M, 1975. The Proteins. 3rd Ed. New York: Academic Press. Vol. I: 180-206.

MODIFICATIONS OF THE PROTEIN IMMUNOBLOTTING TECHNIQUES

Wu Chuanfen[①]　Dai Jialing[②]　Li Jingyan[②]　Wang Yongchao[①]

(①*Dept. of Biology, Beijing Normal University, Beijing* 100875)

(②*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution Kunming Inst. of Zool., the chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Abstract

The authors made some improvments of the protein immunoblotting techniques during studies on the centromere proteins in sone protists. The main modifications reported in this paper are as followings.

1. Separating gels were modified from a uniform polyacrylamide gel of 12% to linear

gradient gels of 5%-12% (or 15%), stacking gel from 5% to 3%, and the separation of protein bands in the gel was much improved.

2. Traching dye was changed from bromphenol blue to the pigments in *Euglena gracilis* SDS-PAGE sample, and the proper electrophoresis stop can be conveniently determined.

3. Electrophoretic transfer was changed from 400 mA, 3.5 hurs to 200 mA, 17 hurs; the cooling of transfer from air in refrigerator of 4 degree centigrades to flowing water bath, so that the transfer was cooled more successfully.

4. The NC memberanes were washed thoroughly with double distilled water, then treated with with 0.1% Triton X-100-TBS after transfer, in order to remove SDS in the protein bands transfered.

5. The incubation of antigen-antibody reactions were modified from RT or 37 degree centigrades, 1-2 hurs to 4 degree centigrades, thus the backgroung of blotting was much reduced and the specificity of antigen-antibody reactions were much improved.

Key words Western immunoblotting, Electorphoresis, Electrophoretic transfer